

III MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Patologi Entomologi Mikrobiologi (PEM) Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau Pekanbaru pada bulan September sampai dengan November 2017. Penelitian akan dilaksanakan dengan cara tiga tahap yaitu pengambilan sampel di PTPN V Sei Pagar, analisis di laboratorium PEM dan uji reaksi biokimia di UPT laboratorium kesehatan. Pengambilan sampel dilakukan di lokasi tempat kolam limbah pabrik kelapa sawit ditampung. Sampel yang akan diambil berupa lumpur (*Sludge*) yang sudah mengendap pada dasar kolam penampungan limbah kelapa sawit.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah NaCl fisiologis, Aquades, dan media selektif Pikovskaya (PVK) yang terdiri dari aquades, glukosa, trikalsium fosfat ($(\text{Ca}_3)\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , FeSO_4 , ekstrak ragi (*yeast extract*) dan agar bacto. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunsen, pipet volume, gelas beker, autoklaf, pH meter, vortex, cawan petri, *hot plate*, batang kaca penyebar, Erlenmeyer, thermometer, timbangan analitik, *laminar air flow*, jarum ose, tabung reaksi, batang L, inkubator dan alat sederhana untuk mengambil sampel.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode observasi lapangan pada kolam limbah cair pabrik kelapa sawit. Sampel lumpur (*sludge*) diambil secara *purposive sampling* dengan menentukan 4 titik pengambilan sampel pada kolam limbah. Pengambilan sampel ± 100 gram pada tiap titik. Sampel yang sudah diambil kemudian dikompositkan untuk dilakukan isolasi dan identifikasi sampel tersebut.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian adalah limbah padat atau *sludge* yang diambil dari kolam aerasi instalasi pengolahan air limbah (IPAL). Sampel diambil secara *purposive sampling* dengan empat titik sudut kolam limbah sebanyak ± 100 gram. Ukuran untuk setiap IPAL adalah panjang atas 132 M dan panjang bawah 114 M, serta lebar atas 25M dan lebar bawah 20M, dengan kedalam 5,5 M dan volume 15,221 M³.



Gambar 3.1. (A) Titik Pengambilan Sampel. (B) Alat dalam Mengambil *Sludge*.

Sampel diambil menggunakan alat sederhana terbuat dari kaleng yang dibentuk seperti penyaring agar memudahkan dalam mendapatkan lumpur (*sludge*) yang diberi tongkat kayu panjang untuk menjangkau dasar kolam limbah. Sampel kemudian dikompositkan dan dimasukkan dalam plastik steril yang dibungkus dengan rapat.

3.4.2 Pembuatan Media Nutrien Agar (NA)

Pada penelitian ini media Nutrien Agar (NA) digunakan sebagai media pembiakan bakteri dan enumerasi. Pembuatan media instan NA dalam bentuk powder dalam satu liter : 1) Media ditimbang sebanyak 28 gram kemudian masukkan media kedalam *Erlenmeyer*. 2) Tambahkan aquades 1 liter kemudian panaskan menggunakan *hot plate* dan *magnetic stirrer*, setelah tercampur dengan rata beri penutup kapas dan *aluminium foil* pada mulut tabung erlenmeyer. 3) Kemudian lakukan sterilisasi media menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C

selama 15 menit. 4) Tuang media steril ke cawan petri secara aseptik di dalam *Laminar air flow*, diamkan media sehingga berubah menjadi padat.

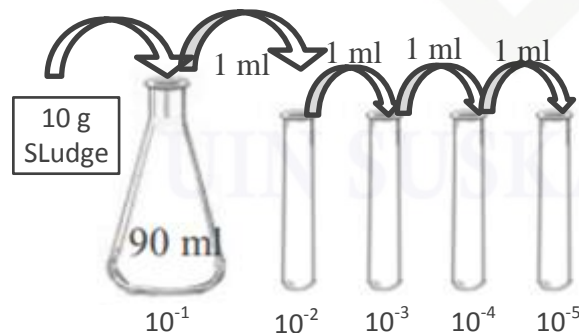
3.4.3 Pengukuran pH Sampel

Pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter dengan rasio 1:5. Sampel lumpur (*sludge*) ditimbang seberat 10 g kemudian dimasukkan ke dalam tabung *Erlenmeyer* yang berisi aquades 50 ml. Setelah itu sampel dishaker menggunakan *orbital shaker* selama 30 menit dengan kecepatan 100 rpm, kemudian suspensi diukur menggunakan pH meter (Irfan, 2014).

3.4.4 Enumerasi Bakteri

a. Pengenceran Sampel

Pengenceran sampel lumpur (*sludge*) dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow* agar tidak terjadi reaksi kontaminasi dari bakteri lain. Sampel lumpur (*sludge*) sebanyak 10 g ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam tabung elenmeyer 90 ml yang berisi larutan NaCl fisiologis kemudian dihomogenkan menggunakan *orbital shaker* selama 1 jam dengan kecepatan 100 rpm. Pengenceran pertama dijadikan sebagai pengenceran 10^{-1} , dari pengenceran pertama diambil 1 ml menggunakan *micropipet* kemudian dipindahkan kepengenceran selanjutnya ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCL fisiologis. Sebelum dilakukan pemindahan, tabung reaksi tersebut di vortex agar suspensi dalam pengenceran menjadi homogen (Hastuti dan Ginting, 2007). Pengenceran dilakukan dari 10^{-1} - 10^{-7} . Dapat terlihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.2 Pengenceran berseri

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

b. Penanaman Isolat

Penanaman dari suspensi larutan *sludge* diambil dari tiga pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} yang akan ditanam di media PVK sebanyak 0,5 ml dengan menggunakan *micropipet*. Sebelum penanaman larutan *Sludge* harus divortex terlebih dahulu selama satu menit agar suspensi menjadi homogen. Setiap penanaman diulang dua kali (duplo). Selanjutnya disebar dengan batang penyebar steril (celupkan batang penyebar dalam etanol dan bakar, setelah diperkirakan dingin baru digunakan). Beri label di bagian pinggir tiap cawan Petri (gunakan kode singkatan pengenceran). Inkubasi cawan Petri pada posisi terbalik selama 2x24 jam dengan suhu 37°C (Hastuti dan Ginting, 2007).

c. Menghitung Jumlah Koloni

Perhitungan jumlah koloni menggunakan metode cawan hitung. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah cawan petri yang mengandung koloni antara 30-300. Rumus menghitung jumlah koloni dalam satuan *Colony Forming Unit* (CFU) adalah sebagai berikut :

$$\text{Jumlah CFU} = \frac{1}{\text{Vol Sampel}} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}} \times \text{Jumlah Koloni dalam Petri}$$

3.4.5 Pemurnian Bakteri

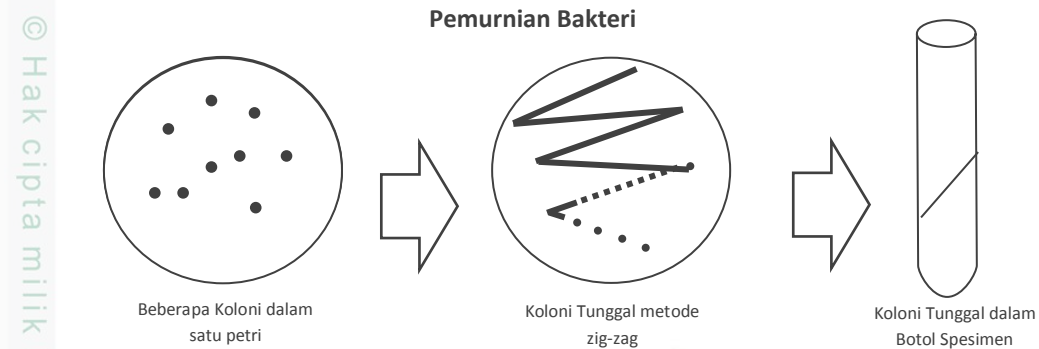
Isolat bakteri yang didapat dimurnikan untuk mendapatkan biakan murni. Sebelum melakukan pemurnian, kawat oce disterilkan terlebih dahulu dengan cara dipijarkan hingga merah kemudian didinginkan lalu digunakan untuk mengambil koloni bakteri dalam cawan petri. Pemurnian bakteri dilakukan dengan cara digoreskan secara zig-zag pada media *Nutrien Agar* (NA). Media tersebut diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C. Koloni Tunggal yang terpisah dari goresan zig-zag dianggap sebagai koloni tunggal yang kemudian disimpan di botol spesimen untuk dilakukan uji-uji selanjutnya. Proses pemurnian dapat dilihat pada Gambar 3.2.

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

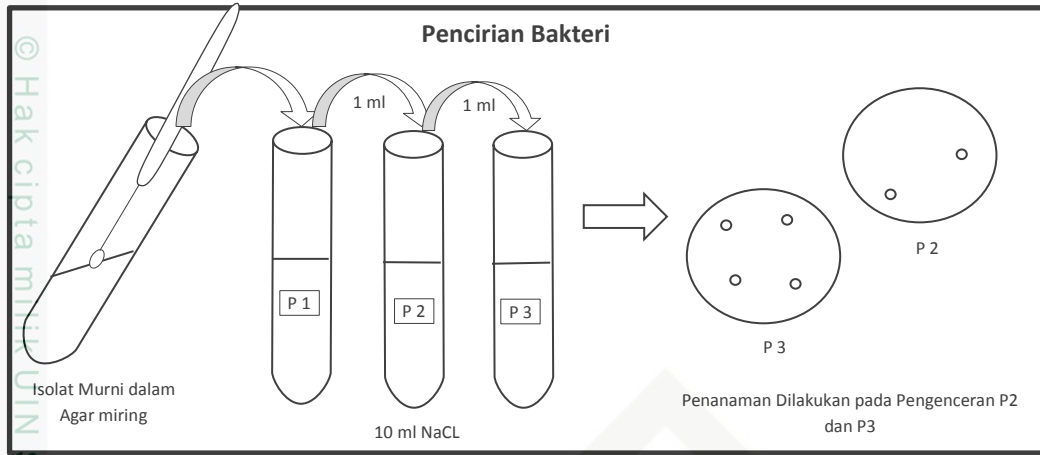


Gambar 3.3. Pemurnian Bakteri

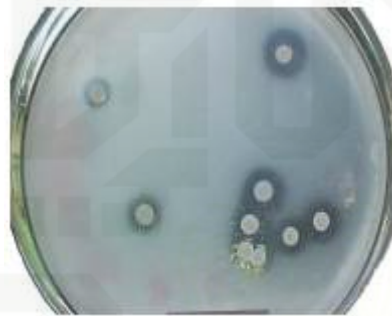
3.4.6 Skrining Bakteri Pelarut Fosfat

Bakteri pelarut fosfat dalam media Pikovskaya ditandai dengan terbentuknya zona bening. Kegiatan ini dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat-isolat BPF yang telah dikoleksi sebelumnya pada media PVK. Isolat diinkubasi selama 72 jam pada suhu ruangan (Islamiati dan Zulaika, 2015). Koloni yang tumbuh dan mampu membentuk zona bening diindikasikan sebagai isolat yang mampu melarutkan fosfat. Isolat BPF yang mempunyai nilai IKF $\geq 2,5$ akan digunakan dalam kegiatan penelitian selanjutnya.

Pembuatan media instan pikovskaya dilakukan dengan aseptik sama halnya dalam pembuatan media tanam lainnya. 1) Komposisi per liter media pikovskaya yaitu: 10 g Glukosa, 5 g Trikalsium fosfat (Ca_3PO_4); 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 g KCl; 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; MnSO_4 (*trace*); FeSO_4 (*trace*); 0,5 g ekstrak ragi (*yeast extract*) dan 20 g agar bacto (Niswati, 2008). 2) Semua bahan dilarutkan dengan aquades hingga volume 1 liter dalam tabung elenmeyer yang dipanaskan menggunakan *hot plate* serta *magnetic stirrer* yang berfungsi untuk mempercepat dalam proses pelarutan. 3) Medium yang sudah homogen ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*. 4) Medium disterilisasi menggunakan autoclaf dengan suhu 121°C selama 20 menit (Ulfiyati dan Zulaika, 2015). 5) Medium yang sudah sterilisasi kemudian didiamkan sejenak hingga suhu medium $\pm 45^\circ\text{C}$, kemudian dituang secara aseptik pada cawan petri dengan volume ± 15 ml yang dilakukan dalam *laminar air flow*.

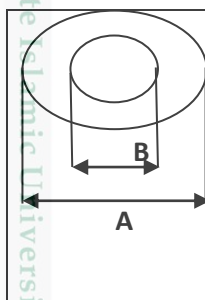


Gambar 3.4. Metode Pencirian Bakteri



Gambar 3.5. Koloni bakteri pelarut fosfat (BPF) tumbuh pada media Pikovskaya yang membentuk zona bening (Santosa, 2007).

Untuk efisiensi pelarut dari masing-masing isolat dapat dihitung berdasarkan hubungan antara diameter koloni dengan diameter zona bening (Karpagam dan Nagalakshmi, 2014.).



$$IKF = \frac{\text{Diameter Total (mm)}}{\text{Diameter koloni (mm)}}$$

Keterangan :

A = Diameter Total
B = Diameter koloni

Hasil zona bening yang terbentuk diklasifikasikan sesuai Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Kemampuan Isolat BPF Dalam Melarutkan Trikalsium Fosfat

Diameter	Kekuatan Daya Hambat
≤ 1,59	Rendah
1,6 – 2,12	Sedang
2,15 – 2,59	Kuat
2,6 – 3	Sangat kuat

Sumber : Ruwandani dkk, 2016

3.5 Parameter Pengamatan

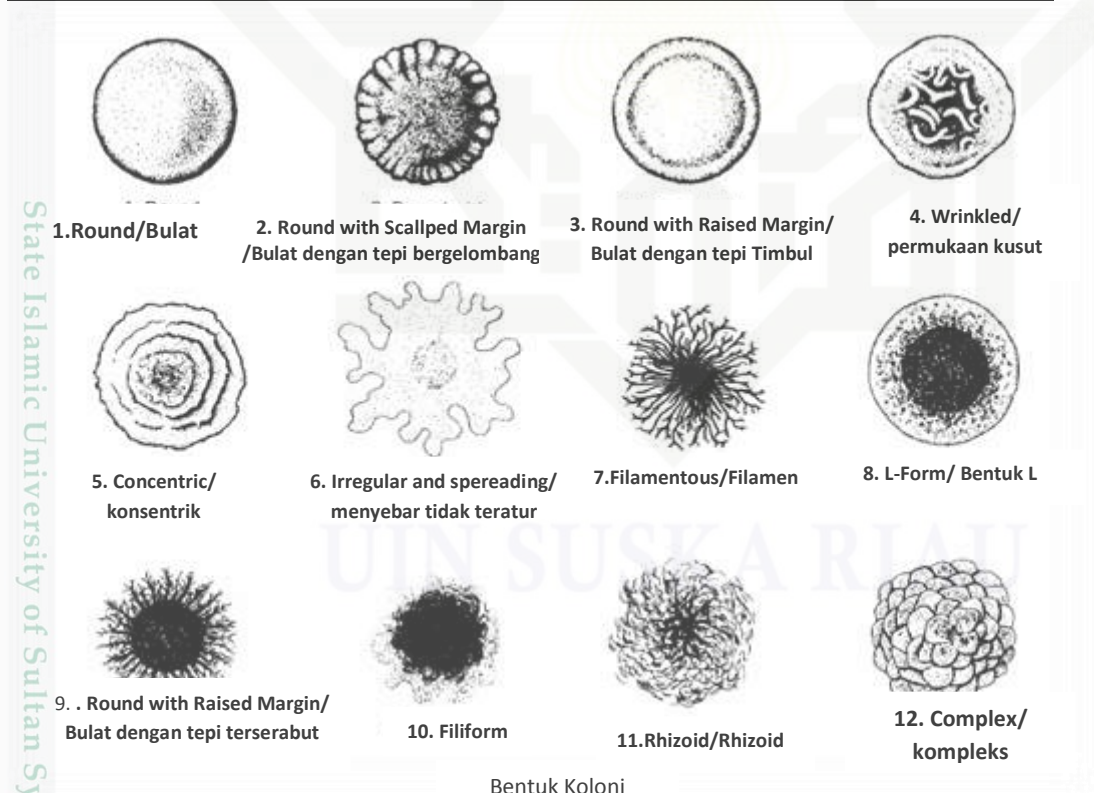
3.5.1. Identifikasi Bakteri Secara Makroskopis

Bakteri yang tumbuh hasil inkubasi diamati secara langsung (makroskopis) pada bentuk koloni, permukaan koloni, elevasi, tepi dan warna koloni berdasarkan Tabel parameter 3.2 menurut Saragih (2013) sebagai berikut :

a. Pengamatan Koloni Bakteri

Tabel 3.2. Pengamatan Morfologi Makroskopis (Saragih, 2013).

Variabel	Kriteria
Bentuk koloni dari atas.	Bulat, Bulat dengan tepi bergelombang, Bulat dengan tepi Timbul, permukaan kusut, Konsentrik, Menyebar tidak teratur, Filamen, Bentuk L, Bulat dengan tepi terserabut
Permukaan koloni	Filiform, Rhizoid, kompleks.
Elevasi	Mengkilat, tidak mengkilat
Tepi koloni	Datar, Timbul, Konvek, Gunung, Umbonat, Berbukit, Masuk ke dalam Media, Krateriform.
	Halus, bergelombang, lobal, tidak teratur, sillat, bercabang, wol, benang, rambut.
Warna koloni	Berwarna (sebutkan), tidak berwarna



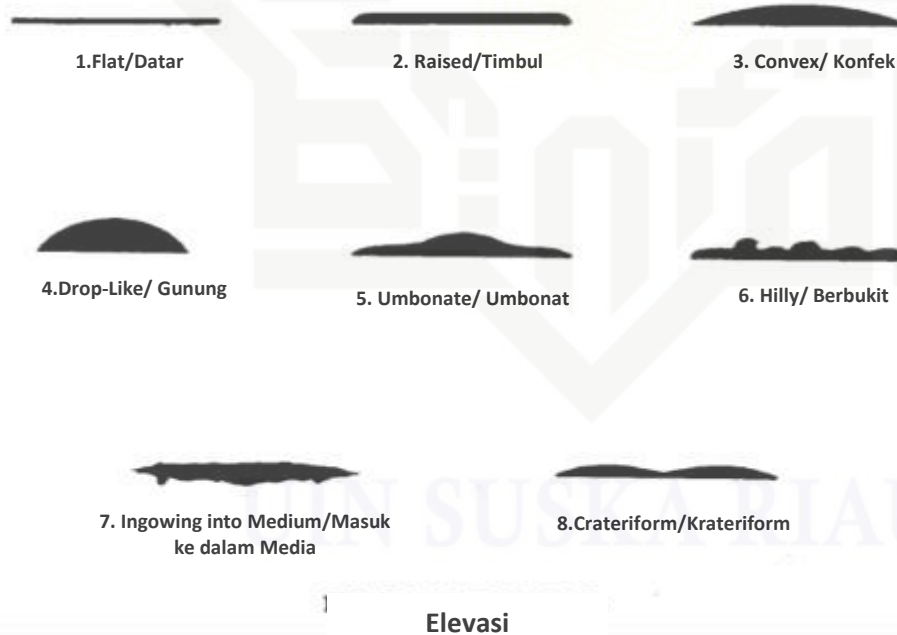
Gambar 3.6. Bentuk Morfologi dari Atas (Hadioetomo, 1993)

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Diarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Diarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.



Gambar 3.7. Bentuk Morfologi dari Tepi (Hadioetomo, 1993)



Gambar 3.8. Bentuk Morfologi dari Bentuk Penonjolan (Hadioetomo, 1993)

3.5.2. Identifikasi Mikroskopis

a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram bertujuan untuk membedakan bakteri menjadi dua kelompok yakni, bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri yang digunakan yaitu bakteri yang berumur kurang dari 20 jam (Irfan, 2014). Prosedur kerja dari pewarnaan gram ini yaitu membersihkan preparat glass dengan menggunakan alkohol 70% kemudian di fiksasi di atas bunsen, beri label pada bagian bawah *preparat glass*. Sebelum pengambilan bakteri pijarkan terlebih dahulu jarum ose lalu dinginkan sejenak, kemudian ambil bakteri dari media dengan cara aseptik lalu diratakan diatas preparat glass, keringkan teteskan larutan zat warna methylen blue sebanyak 1 atau 2 tetes keringkan selama 30 detik, cuci dengan aquades, keringkan preparat dengan dianginkan, kemudian teteskan 1 atau 2 tetes larutan lugol selama 1 menit kemudian bilas dengan alkohol 70 % dan dicuci dengan aquades, terakhir tetes larutan sebanyak 1-2 tetes selama 30 detik kemudian bilas dengan aquades kembali dikeringkan dan diamkan terakhir amati di bawah mikroskop (Fitrah, 2015). Hasil positif ditandai dengan munculnya warna ungu, sedangkan hasil negatif ditandai dengan munculnya warna merah muda (Pratita dan Putra, 2012).

b. Reaksi Biokimia

Identifikasi dengan cara reaksi biokimia akan dilakukan sampai tingkat genus. Ciri- ciri makroskopis dan mikroskopis yang didapat akan merujuk pada buku Bergey's untuk memilih golongan bakteri yang didapat.

a. Uji Katalase

Uji katalase digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim katalase pada bakteri. Uji katalase dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet* dengan menumbuhkan bakteri di media PVK pada cawan petri, kemudian diinkubasi selama 1 hari, Kaca objek dibersihkan dengan alkohol untuk menghilangkan lemak dan debu. Satu ose isolat BPF diambil dan diratakan diatas kaca objek, lalu ditetaskan dengan larutan H_2O_2 3% 2-3 tetes (Hajar, 2012). Pengamatan uji katalase dilakukan dengan cara mengambil satu ose biakan bakteri

1. Diarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Diarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

kemudian diletakkan pada gelas objek dan ditetesi hydrogen peroksida (H_2O_2) 3%. Uji positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara disekitar biakan koloni tersebut (Hadioetomo, 1993).

b. Uji Oksidase

Uji oksidase dilakukan untuk membantu mengidentifikasi kelompok bakteri dengan kemampuan bakteri menghasilkan oksidase (Hadioetomo, 1993). Uji Oksidase dilakukan dengan mengoleskan bakteri dalam cawan yang kemudian menggenangnya dengan reagen uji oksidase (larutan dimetil-p-fenildiamina hidroklorida 1%) (Hadioetomo, 1993). Reaksi ditunggu selama 30 detik, Hasil positif ditandai dengan munculnya warna ungu, sedangkan hasil negatif ditandai dengan munculnya warna merah muda (Pratita dan Putra, 2012).

c. Uji TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*)

Uji TSIA dilakukan dengan menumbuhkan biakan bakteri pada permukaan media TSIA miring, dan diinkubasi selama 1 x 24 jam, kemudian dilakukan pengamatan terhadap hasil uji. Hasil uji dengan warna medium kuning menandakan asam, warna medium menjadi lebih merah menandakan medium menjadi basa. Warna medium menjadi lebih hitam menandakan terbentuknya gas H_2S dan bila medium terangkat menandakan bahwa mikroba tersebut mampu untuk memproduksi gas H_2S (Sardiani, dkk., 2015).

d. Uji SIM (*Sulfida Indole Motility*)

Uji motilitas dilakukan dengan menumbuhkan biakan bakteri pada media SIM, dengan cara menusukkan jarum ose yang telah dioleskan bakteri kedalam media SIM semisolid, kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam. Kemudian dilakukan pengamatan hasil uji dengan melihat pertumbuhan gerak bakteri pada bekas tusukan jarum ose. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pergerakan pada bekas tusukan, dan hasil negatif apabila tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Sedangkan uji indol, dilakukan dengan meneteskan larutan *kovacks* pada biakan bakteri kemudian melihat hasil uji yang ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media.



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

e. Uji SCA (*Simmonts Citrat Agar*)

Uji SCA dilakukan dengan menumbuhkan biakan bakteri pada media *Simmonts Citrat Agar* kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam, dan kemudian dilakukan pengamatan terhadap hasil uji, yakni terjadinya perubahan warna pada media, hasil positif ditunjukkan dengan warna biru, sedangkan hasil negatif tidak terjadinya perubahan warna (tetap hijau).

f. Uji Fermentasi

Uji fermentasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan asam. Isolat bakteri diambil 1 ose dan dimasukkan ke dalam *Phenol red broth glucoce* lalu diaduk. Media yang telah berisi isolat, diinkubasi selama 2 hari. perubahan warna yang terjadi diamati, warna merah untuk mendikasikan bakteri yang tidak menghasilkan asam dan warna kuning untuk mengindikasikan adanya asam (Pratita dan Putra, 2012).

g. Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh dari parameter pengamatan seperti penghitungan jumlah populasi, pengukuran zona bening, dan identifikasi bakteri, akan disajikan dalam bentuk tabel.

3.9.

Alur Penelitian Isolasi dan identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat

© Hak cipta milik UIN Suska Riau

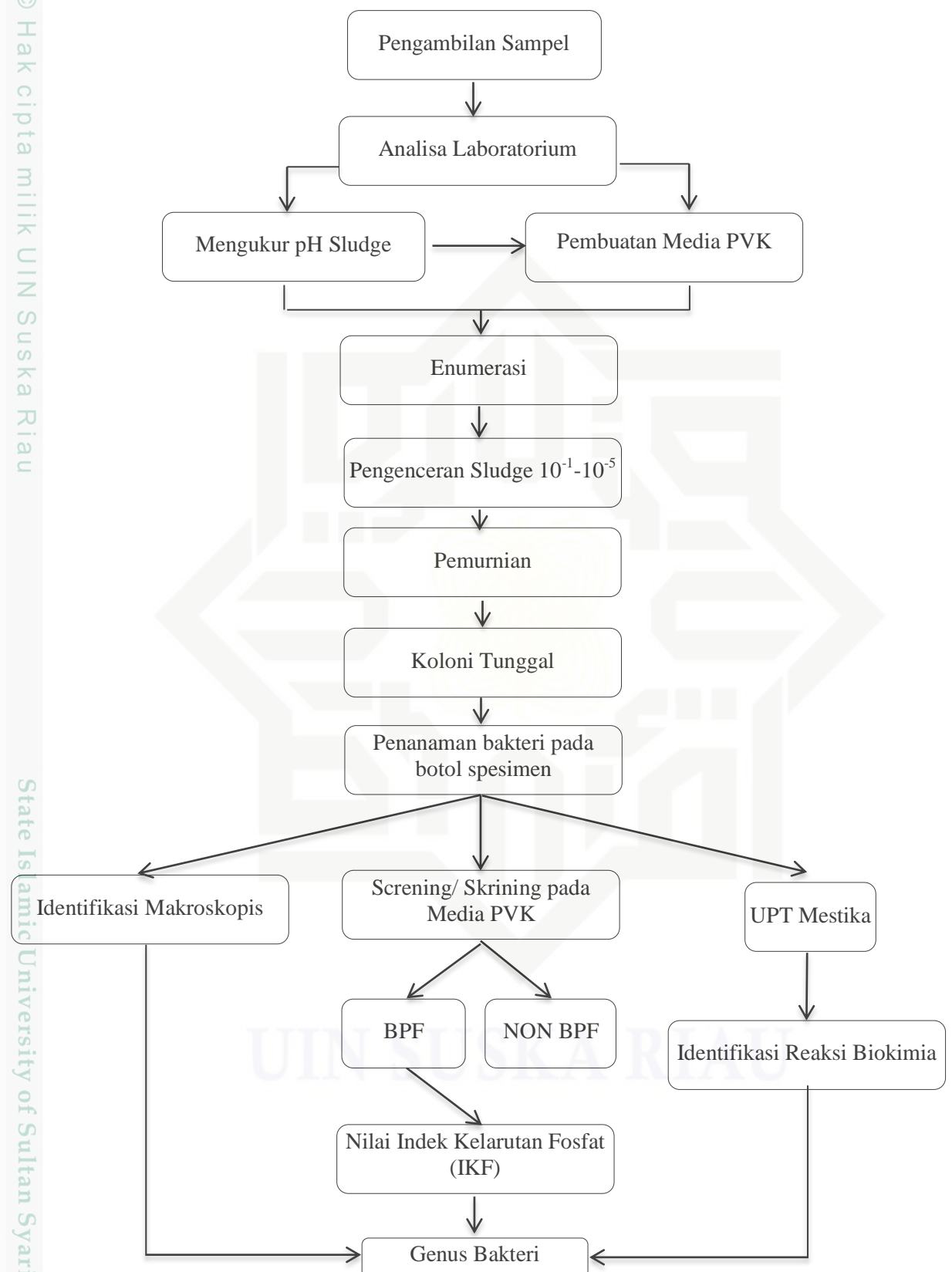
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

State Islamic University of Sultan Syarif Kasim Riau



Gambar 3.9. Alur Penelitian Isolasi dan identifikasi Bakteri Pelarut Fosfat